

AK

060808-1.txt

3/5/1

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2006 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0013407774

WPI ACC NO: 2003-498125/

XRAM Acc No: C2003-133313

XRPX Acc No: N2003-396004

Amplifying target nucleic acid by using upstream oligonucleotide primer and a chimeric oligonucleotide primer which is complementary to template nucleic acid and has deoxyribonucleotide or nucleotide analog at one end

Patent Assignee: TAKARA BIO KK (TAKA-N)

Inventor: ENOKI R; KATO I; SAGAWA H

Patent Family (1 patents, 1 countries)

Patent

Application

Number

Kind

Date

Number

Kind

Date

Update

JP 2003052380 A 20030225 JP 2001249478 A 20010820 200347 B

Priority Applications (no., kind, date): JP 2001249478 A 20010820

Patent Details

Number	Kind	Lan	Pg	Dwg	Filing Notes
JP 2003052380	A	JA	21	1	

Alerting Abstract JP A

NOVELTY - A template nucleic acid, deoxyribonucleotides, DNA polymerase, a chimeric oligonucleotide primer, an upstream oligonucleotide primer and RNaseH are mixed and a reaction mixture is prepared and incubated to facilitate amplification. The chimeric oligonucleotide is substantially complementary to the base sequence of the template nucleic acid and contains a deoxyribonucleotide or nucleotide analog at its 3'-terminal end.

DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are included for the following:

- 1.composition for nucleic acid amplification;
- 2.kit for nucleic acid amplification; and
- 3.detecting a target nucleic acid sequence.

USE - For nucleic acid amplification and subsequent detection of a target nucleic acid (claimed).

ADVANTAGE - The method is highly sensitive.

Title Terms /Index Terms/Additional Words: AMPLIFY; TARGET; NUCLEIC; ACID; UPSTREAM; PRIME; CHIMERIC; COMPLEMENTARY; TEMPLATE; NUCLEOTIDE; ANALOGUE; ONE; END

Class Codes

International Classification (Main): C12N-015/09

(Additional/Secondary): C12Q-001/68, G01N-033/53, G01N-033/566

File Segment: CPI; EPI

DWPI Class: B04; D16; S03

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Manual Codes (CPI/A-M): B04-B03B; B04-E01; B04-E05; B04-L04A; B04-L05; B11-C08E3; B12-K04F; D05-A02B; D05-A02C; D05-H09; D05-H12A; D05-H12B; D05-H12D1; D05-H18B

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-52380

(P2003-52380A)

(43)公開日 平成15年2月25日(2003.2.25)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 21 頁)

(21)出願番号 特願2001-249478(P2001-249478)

(22)出願日 平成13年8月20日(2001.8.20)

(71)出願人 302019245

タカラバイオ株式会社

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

(72)発明者 榎 竜嗣

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造

株式会社中央研究所内

(72)発明者 佐川 裕章

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造

株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造

株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸の増幅方法

(57)【要約】

【課題】 試料中の標的核酸を高感度・特異的に増幅する核酸の増幅方法、該方法を利用した標的核酸の検出方法、該方法のための組成物及びキットを提供すること。

【解決手段】 キメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせて使用した試料中の標的核酸を高感度・特異的に増幅する核酸の増幅方法、該方法を用いた標的核酸の検出方法、該方法のためのキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物及びキット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸を増幅する方法において、(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、少なくとも1種類の上流オリゴヌクレオチドプライマー、およびRNase Hを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり、該上流オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該キメラオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に相補的な領域の3'側の塩基配列に実質的に相補的であり；および、(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、を包含することを特徴とする核酸の増幅方法。

【請求項2】 さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有する第2のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することを特徴とする請求項1記載の核酸の増幅方法。

【請求項3】 さらに鋳型となる核酸の第2のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列に実質的に相同な配列を有する領域の3'側の塩基配列と実質的に相同な配列を第2の上流オリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することを特徴とする請求項2記載の核酸の増幅方法。

【請求項4】 請求項1から3のいずれか1項に記載の核酸の増幅方法のための組成物であって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物。

【請求項5】 請求項1から3のいずれか1項に記載の核酸の増幅方法のためのキットであって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを含有するキット。

【請求項6】 下記工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法；(a) 請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；および、(b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程；を包含する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、臨床分野において有用な標的核酸の検出方法及び遺伝子工学分野において有用なDNAの合成方法に関し、鋳型となる核酸の増幅方法および該方法で増幅された標的核酸の検出方法に関

する。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子工学分野の研究においてDNAの合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖のDNAの合成を除けば、そのほとんどはDNAポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)があるが、それは米国特許第4,683,195号、第4,683,202号および第4,800,159号に詳細に記述されている。もう一つの例としては、トレンドズ イン バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology)第10巻、146～152頁(1992)に記載の当該方法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写PCR法(RT-PCR法)が挙げられる。上記の方法の開発により、DNAから、若しくはRNAから目的とする領域を増幅することが可能になった。

【0003】 これらのDNA合成方法は、目的とするDNA領域を増幅させるために例えば、二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離(変性)、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成(伸長)の3つのステップからなる反応により、もしくは、"シャトルPCR"('PCR法最前線'、'蛋白質 核酸 酵素'別冊、第41巻、第5号、425頁～428頁(1996))と呼ばれる、前述の3ステップ反応のうちプライマーのアニーリングおよび伸長のステップを同一温度で行なう2ステップ反応により実施される。

【0004】 さらに、別法としては、1989年6月14日に公開された欧州特許出願第320,308号に記述されているリガーゼ連鎖反応(LCR; ligase chain reaction)法、あるいはPCRプロトコールズ(PCR Protocols, Academic Press, Inc., 1990)245～252頁に記述されている転写増幅システム(TAS; transcription-based amplification system)法が挙げられる。上記4法は、次の増幅サイクルのための一本鎖標的分子を再生するために、高温から低温の反応を何回も繰り返す必要がある。このように温度によって反応が制約されるため、反応系は不連続な相またはサイクルで行なう必要がある。

【0005】 従って、上記の方法には広い温度範囲で、かつ、厳密な温度調整を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2種類～3種類の温度条件で行なうため設定温度にするために要する時間が必要であり、そのロス時間はサイクル数に比例して増大していく。

【0006】 そこで、上記問題点を解決すべく等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発された。例えば、特公平7-114718号に記載の鎖置換型増幅(SDA; strand displacement amplification)法、自立複製(3SR; self-sustained sequence replication)法、日本

国特許番号第2650159号に記載の核酸配列増幅

(NASBA; nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (transcription-mediated amplification) 法、日本国特許番号第2710159号に記載のQ β レプリカーゼ法、さらに米国特許番号第5,824,517号、国際公開第99/09211号パンフレット、国際公開第95/25180号パンフレットあるいは、国際公開第99/49081号パンフレット等に記載の種々の改良SDA法が挙げられる。米国特許番号第5,916,777号には等温状態でのオリゴヌクレオチドの酵素的合成方法が記載されている。これらの等温核酸増幅法またはオリゴヌクレオチド合成法の反応においては、プライマーの伸長や、一本鎖伸長生成物（または元の標的配列）へのプライマーのアニールリングや、それに続くプライマーの伸長は、一定温度で保温された反応混合物中で同時に起こる。

【0007】これらの等温核酸増幅法のうち最終的にDNAが増幅される系、例えば、SDA法は、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼを介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列（およびその相補鎖）の増幅法であるが、該方法では、増幅に使用するプライマーは4種類必要であり、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように構築する必要がある。また、該方法では、DNA合成のための基質として、修飾されたデオキシリボヌクレオチド3リン酸、例えば α 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子(S)に置換された(α -S)デオキシリボヌクレオチド3リン酸を大量に用いる必要があり、ルーチンワークで反応を行なう遺伝子検査等においては、そのランニングコストが深刻な問題となってくる。さらに該方法では、増幅されたDNA断片中に上記の修飾ヌクレオチド、たとえば(α -S)デオキシリボヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅後のDNA断片を制限酵素長多型(RFLP; restriction enzyme fragment length polymorphism)解析に供しようとする場合に、該断片が制限酵素で切断できないことがある。

【0008】また、米国特許番号第5,824,517号記載の改良SDA法は、RNAとDNAから構成され、少なくとも3'末端にDNAが配置された構造を必須要件とするキメラプライマーを使用するDNA増幅方法である。また、国際公開第99/09211号パンフレットに記載の改良SDA法は、3'突出末端を生じさせる制限酵素が必要である。また、国際公開第95/25180号パンフレットに記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマー対を必要とする。さらに、国際公開第99/49081号パンフレットに記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマーと少なくとも1種類の修飾デオキシリボヌクレオチド3リン酸を必要とする。一方、米国特許番号第5,916,777号は、オリゴヌクレオチドを合成するために、3'末端にリボ

ヌクレオチドを有するプライマーを使用してDNAを合成し、反応終了後にエンドヌクレアーゼによりプライマー伸長鎖中のプライマーと伸長鎖の間にニックをいれて分離させ、テンプレートを消化し、さらにプライマーを回収して再利用するというものである。該方法では、プライマーを再利用する際には反応系よりプライマーを単離したうえで鋳型を再度アニールリングさせる必要がある。また、国際公開第00/28082号パンフレットに記載のLAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法は増幅に4種類のプライマーを必要とし、また、増幅産物は増幅の標的とされた領域が繰り返された、サイズの一定しないDNAである。

【0009】さらに、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いた等温核酸増幅方法として、国際公開第00/56877号パンフレットに記載のICAN (Isothermal Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法がある。しかしながら、従来の等温核酸増幅法はまだ種々の問題をかかえており、低ランニングコストで、かつ結果的に得られたDNA断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することが可能な核酸の増幅方法が求められていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の主な目的は、試料中の標的核酸の高感度、特異的に増幅する標的核酸の増幅方法、及びこれらの方法に用いる組成物及びキットを提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の結果、国際公開第00/56877号パンフレットに記載のICAN法において、キメラオリゴヌクレオチドプライマー及び鋳型となる核酸の該プライマーのアニールリングする位置の3'側にアニールリングする上流オリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせる使用することにより、標的核酸の増幅効率が向上し、検出感度が改善されることを見だし、本発明を完成させた。

【0012】すなわち、本発明の第1の発明は、核酸を増幅する方法において、(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド3リン酸、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、少なくとも1種類の上流オリゴヌクレオチドプライマー、およびRNase Hを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドとを含有し、該リボヌクレオチドは該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり、該上流オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の当該キメラオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に相補的な領域

の3'側の塩基配列に実質的に相補的であり；および、
(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、を包含することを特徴とする核酸の増幅方法に関する。

【0013】本発明の第1の発明において、さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有する第2のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用してもよい。さらに鋳型となる核酸の第2のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列に実質的に相同な配列を有する領域の3'側の塩基配列と実質的に相同な配列を第2の上流オリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用してもよい。

【0014】本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の核酸の増幅方法のための組成物であって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを含有する組成物に関する。

【0015】本発明の第3の発明は、本発明の第1の発明の核酸の増幅方法のためのキットであって、それぞれ少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを含有するキットに関する。

【0016】本発明の第4の発明は、下記工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法であって；

(a) 本発明の第1の発明の核酸の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；および、(b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程；を包含する標的核酸の検出方法に関する。

【0017】

〔発明の詳細な説明〕本明細書においてデオキシリボヌクレオチド（本明細書中ではdNとも記載する）とは、糖部分がD-2-デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミンを有するものが挙げられる。さらに、7-デアザグアノシン等の修飾塩基を有するデオキシリボヌクレオチドやデオキシイノシンヌクレオチドのようなデオキシリボヌクレオチドアナログも上記のデオキシリボヌクレオチドに包含される。

【0018】本明細書においてリボヌクレオチド（本明細書中ではNとも記載する）とは、糖部分がD-リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該リボヌクレオチドには修飾リボヌクレオチドが包含され、例えば α 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えた修飾リボヌクレオチド〔(α -S)リボヌクレオチド、(α -S)Nとも記載する〕やその他の誘導体等も含まれる。

【0019】本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーの3'末端又は3'末端側にリボヌクレオチドを配置し、本発明の方法において

核酸鎖が伸長でき、エンドヌクレアーゼで切断でき、鎖置換反応を行うことができるものであれば、いずれもが本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーに包含される。

【0020】本明細書において3'末端側とは、核酸、例えば、プライマーにおいてその中央より3'末端にかけての部分指す。同様に5'末端側とは、核酸においてその中央より5'末端にかけての部分指す。

【0021】本明細書において上流位置とは、本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端よりもさらに5'側の任意の位置を言う。従って、キメラオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングする鋳型となる核酸鎖から見ると該プライマーのアニーリング位置よりも3'側の任意の位置である。

【0022】本明細書においてエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、該プライマーのリボヌクレオチド部分を特異的に切断するものであればよい。

【0023】本明細書においてDNAポリメラーゼとは、DNA鎖を鋳型として新たなDNA鎖を合成する酵素のことを言い、天然型のDNAポリメラーゼの他、前記活性を有する変異体酵素も包含される。当該酵素としては、例えば鎖置換(Strand displacement)活性を有するDNAポリメラーゼ、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有していないDNAポリメラーゼ、逆転写酵素活性やエンドヌクレアーゼ活性を併せ持つDNAポリメラーゼが挙げられる。

【0024】本明細書において「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換(strand displacement)することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを「置換鎖」と称する。

【0025】以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマー

本発明の方法において使用されるプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択されるものとリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。該プライマーには未修飾リボヌクレオチドおよび/または修飾リボヌクレオチドを含有するオリゴリボヌクレオチドプライマーも含まれる。

【0026】本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な塩基配列を有し、使用される条件において、DNA鎖の伸長に寄与することができ、さらに、その3'末端又は3'末端側にリボヌクレオチド

が配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。当該プライマーは通常、増幅しようとする領域の上流、すなわち鋳型核酸上の増幅しようとする領域に対応する塩基配列の3'側部分に相補的に設計される。なお、ここで「実質的に相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な塩基配列を意味する。

【0027】本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは1以上の修飾リボヌクレオチドを含有するものであってもよい。即ち、本明細書においてリボヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端又は3'末端側に配置され、エンドヌクレアーゼにより認識あるいは切断されるものであれば、未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドのいずれであってもよく、そのような未修飾あるいは修飾リボヌクレオチドのいずれもが包含される。すなわち、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、当該プライマーの機能を失わない範囲で未修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチドを使用することができ、さらにこれらを組合せて使用することができる。このような修飾リボヌクレオチドとしては、特に限定するものではないが、たとえば、リン酸基に結合する酸素原子が硫黄原子に置換された(α -S)リボヌクレオチドや、リボースの2位の水酸基がメトキシ基に置換されたリボヌクレオチドが挙げられる。このような修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、米国特許第5,003,097号記載の硫化反応試薬(グレンリサーチ社製)を用いた方法で調製した(α -S)リボヌクレオチド3リン酸、あるいは2'-OMe-RNA-CEホスホアミ

【0028】また、エンドヌクレアーゼによる切断に耐性を付与するような性質の修飾リボヌクレオチドを含有し、本発明の増幅方法に使用できるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設計してもよく、この様なプライマーは、増幅反応工程におけるエンドヌクレアーゼの切断位置を制御し得る点において有用である。本発明の方法で使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後のDNA断片を一本鎖もしくは二本鎖のいずれの形態で得たいかによって1種類もしくは2種類を使い分けることができる。すなわち、一本鎖DNAが望まれる場合には1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、また、二本鎖が望まれる場合には2種類のプライマーが使用される。

【0029】本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、特に限定するものではないが、約12ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの長さのものが好ましい。さらに好ましくは、約15ヌクレオチドから約40ヌクレオチドの長さのプライマー

である。その塩基配列は使用される反応条件において鋳型核酸にアニーリングするように、実質的に鋳型核酸に相補的な配列であることが好ましい。該プライマーは、後に示す段階で使用されるエンドヌクレアーゼにより認識される配列を3'末端又は3'末端側に含む。

【0030】本発明を何ら限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドを本発明のDNA合成方法にプライマーとして使用することができる。

10 一般式: $5' - dNa - Nb - dNc - 3'$

(a: 1以上の整数、b: 1以上の整数、c: 0または1以上の整数、dN: デオキシリボヌクレオチド及び／又はヌクレオチドアナログ、N: 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド、なお、dNaの部位の一部のdNはNで置換されていてもよく、3'末端のヌクレオチドは当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないような修飾を有していてもよい)

20 例えば、上記一般式においてa=1以上の任意の整数で、b=1、c=0のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、b=2、c=0のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、b=3~5、c=0のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、さらにb=2、c=0~5のキメラオリゴヌクレオチドプライマー等がいずれも本発明に好適に使用できる。即ち、本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端又は3'末端側のリボヌクレオチドの長さは、好ましくは1mer~15mer、さらに好ましくは、1mer~10mer、特に好ましくは1mer~5merである。また、上記一般式

30 中のcの数は、特に限定はなく、本発明の方法に使用できる数を選択すればよいが、通常5以下が好適であり、4、3、2、1、の順に反応結果が良く、特にc=0の場合が最も反応効率がよい。

【0031】本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーよりDNAポリメラーゼで伸長されたDNA鎖(プライマー伸長鎖)に含まれるリボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼで認識あるいは切断されるような構造を有しており、当該リボヌクレオチドはその3'末端又は3'末端側に配置されている。本発明を特に限定するものではないが、例えば、鋳型核酸にアニーリングした、上記の一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAにRNaseHを作用させた場合には、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーのリボヌクレオチド部分が切断され、上記オリゴヌクレオチドプライマーと伸長により合成されたDNA鎖の間にニックの入った二本鎖DNAが生じる。さらに、該ニックの入った部位からDNAポリメラーゼにより鎖置換反応がおこる。従って、プライマーの3'末端から核酸鎖を伸長させることができ、エンドヌクレアー

ぜにより切断されることができ、そしてDNAポリメラーゼにより鎖置換反応ができるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは全て本発明の方法に使用することができる。さらに、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、その3'末端がDNAポリメラーゼによる伸長が不可能な形に修飾されており、エンドヌクレアーゼによる切断によって生じた3'末端からDNAの伸長が行われるものが包含される。

【0032】また、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端側には、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含んでいてもよい。該RNAポリメラーゼとしては、T7 RNAポリメラーゼあるいはSP6 RNAポリメラーゼが例示される。

【0033】さらに本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーはヌクレオチドアナログやその他の物質を含有するものであってもよい。即ち、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、DNAポリメラーゼがその3'末端からポリメラーゼ伸長反応せしめる、プライマーの機能を失わない範囲で1以上のヌクレオチドアナログを含有させることができ、さらに、当該ヌクレオチドアナログは複数の種類のものを組合せて使用することができる。該ヌクレオチドアナログとしては、特に限定はされないが、例えば、デオキシイノシンヌクレオチド、デオキシウラシルヌクレオチドあるいは7-デアザグアニンのような修飾塩基を有するヌクレオチドアナログ、リボースの誘導体を有するヌクレオチドアナログ等を使用することができる。また、本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドは、上記の機能を保持する範囲内で種々の修飾、例えば標識化合物等の付加がなされたデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチドアナログを含有してもよい。

【0034】ヌクレオチドアナログのプライマーへの導入は、プライマー自身の高次構造形成の抑制、鋳型とのアニーリング形成の安定化の観点からも有効である。さらに、同様の目的でリボヌクレオチドをプライマーに導入しても良い。特に限定するものではないが、非特異的なエンドヌクレアーゼ(RNase)によるプライマーの分解を防ぐ観点からは、例えば、(α -S)リボヌクレオチドのような修飾リボヌクレオチドが好適に使用できる。

【0035】これらのキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライド バイオシステムズ社(ABI社、Applied Biosystems Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

【0036】(2) 本発明に使用する上流オリゴヌクレ

オチドプライマー

本発明の方法において使用される上流オリゴヌクレオチドプライマーは、少なくともデオキシリボヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから選択されるものが好適に使用できる。

【0037】本発明の方法において使用される上流オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な塩基配列を有し、該鋳型となる核酸上の上記(1)のキメラオリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング位置のさらに3'側の領域にアニーリングできるものが好適に使用できる。また、上流オリゴヌクレオチドプライマーは、使用される条件において、DNA鎖の伸長に寄与することができるものであれば特に限定はされない。当該プライマーは通常、増幅しようとする領域の上流、すなわち鋳型核酸上の増幅しようとする領域に対応する塩基配列の3'側部分に相補的に設計される。なお、ここで「実質的に相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な塩基配列を意味する。

【0038】本発明の方法で使用する上流オリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後のDNA断片を一本鎖もしくは二本鎖のいずれの形態で得たいかによって1種類もしくは2種類を使い分けることができる。すなわち、一本鎖DNAが望まれる場合には1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。また、二本鎖が望まれる場合にはそれぞれ2種類の上記キメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。

【0039】本発明の方法で使用する上流オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリングする鋳型となる核酸上の位置は、標的核酸の塩基配列、増幅領域の長さ及び組み合わせるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの標的核酸へのアニーリング位置によって最も増幅効率が良いような位置であれば特に限定はないが、例えばキメラオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端から1塩基以上、好ましくは20塩基以上の範囲にその3'末端が位置するように設定される。

【0040】また、本発明の方法において使用される上流オリゴヌクレオチドプライマーは、特に限定するものではないが、約12ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの長さのものが好ましい。さらに好ましくは、約15ヌクレオチドから約40ヌクレオチドの長さのプライマーである。その塩基配列は使用される反応条件において鋳型核酸にアニーリングするように、実質的に鋳型核酸に相補的な配列であることが好ましい。

【0041】また、本発明の上流オリゴヌクレオチドプライマーのGC含量は、特に限定はされないが、40%以上の範囲が好適である。

【0042】さらに本発明の方法において使用される上

流オリゴヌクレオチドプライマーはヌクレオチドアナログやその他の物質を含有するものであってもよい。すなわち、本発明の上流オリゴヌクレオチドプライマーには、DNAポリメラーゼがその3'末端からポリメラーゼ伸長反応せしめる、プライマーの機能を失わない範囲で1以上のヌクレオチドアナログを含有させることができ、さらに、当該ヌクレオチドアナログは複数の種類のものを組合せて使用することができる。該ヌクレオチドアナログとしては、特に限定はされないが、例えば、デオキシイノシンヌクレオチド、デオキシウラシルヌクレオチドあるいは7-デアザグアニンのような修飾塩基を有するヌクレオチドアナログ、リボースの誘導体を有するヌクレオチドアナログ等を使用することができる。また、本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドは、上記の機能を保持する範囲内で種々の修飾、例えば標識化合物等の付加がなされたデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチドアナログを含有してもよい。ヌクレオチドアナログのプライマーへの導入は、プライマー自身の高次構造形成の抑制、鋳型とのアニーリング形成の安定化の観点からも有効である。

【0043】これらの上流オリゴヌクレオチドプライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライドバイオシステムズ社（ABI社、Applied Biosystems Inc.）のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

【0044】（3）本発明に使用されるエンドヌクレアーゼ

本発明に使用されるエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした上記（1）に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、鎖置換反応が起こるように伸長鎖を切断しうるものであればよい。即ち、上記の二本鎖DNAのうちのキメラオリゴヌクレオチドプライマー部分にニックを生成しうる酵素である。特に限定されるものではないが、例えば、本発明にはリボヌクレアーゼが使用でき、特にDNAとRNAとから形成された二本鎖核酸のRNA部分に作用するエンドリボヌクレアーゼH（RNaseH）が好適に使用できる。また、該リボヌクレアーゼには、上記作用を有するものであれば、常温性から耐熱性のリボヌクレアーゼのいずれもが好適に本発明に使用できる。例えば、下記実施例に示すように、約50℃～約70℃での反応では大腸菌（E. coli）由来のRNaseHが本発明の方法に使用することができる。また、本発明の方法においては、耐熱性のリボヌクレアーゼも好適に使用できる。該耐熱性リボヌクレアーゼとしては、特に限定はされないが、例えば市販のHybridaseTM Thermostabl

e RNaseH（エピセンターテクノロジーズ社製）の他、好熱性バチルス（Bacillus）属細菌、サーマス（Thermas）属細菌、ピロコッカス（Pyrococcus）属細菌、サーモトガ（Thermotoga）属細菌、アルカエオグロバス（Archaeoglobus）属細菌等由来のRNaseH等も好適に使用できる。さらに、該リボヌクレアーゼは、天然体および変異体のいずれもが好適に使用できる。なお、本願明細書に記載されているRNaseHの酵素単位は、実施例中の参考例に示した酵素単位測定方法に基づいて表示された数値である。

【0045】また、上記RNaseHは、本発明の方法に使用できるものであれば特に限定はなく、例えば、種々のウイルス、ファージ、原核、真核生物由来のいずれであってもよい。さらに、細胞性RNaseHあるいはウイルス性RNaseHのいずれであってもよい。例えば、上記細胞性RNaseHとしては大腸菌RNaseHIが、ウイルス性RNaseHとしてはHIV-1由来RNaseHが例示される。本発明の方法においてRNaseHは、I型、II型、III型のいずれもが使用できる。特に限定はされないが、例えば大腸菌由来RNaseHI、ピロコッカス属細菌由来あるいはアルカエオグロバス属細菌由来RNaseHIIが好適である。

【0046】また、本発明の方法に使用するエンドヌクレアーゼ、例えば、RNaseHの切断反応の効率は上記プライマーの3'末端近傍の塩基配列に左右され、所望のDNAの増幅効率に影響することが考えられるので、使用するRNaseHに最適なプライマーをデザインすることは当然のことである。

【0047】本明細書において使用されている「ニックを入れる」もしくは「ニックング」という語は、二本鎖核酸の一方の鎖の内部を切断することを意味する。たとえば、RNaseHはDNAとリボヌクレオチドを含むDNAとのハイブリッド二本鎖核酸に作用し、二本鎖のうちのリボヌクレオチドを含む鎖のリボヌクレオチド部分を選択的に切断することにより、当該ハイブリッド二本鎖核酸にニックを入れる。

【0048】（4）本発明に使用されるDNAポリメラーゼ

本発明には、DNAの鎖置換（strand displacement）活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。また、実質的に5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有しないものが特に好適に使用することができる。本発明において、「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換（strand displacement）することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDN

A鎖のこと「置換鎖」と称する。

【0049】本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、上記の鎖置換活性を有するものであれば特に限定はなく、例えば、バチルス カルドテナックス (*Bacillus caldotenax*、以下、*B. ca*と称す) やバチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*、以下*B. st*と称す) 等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌 (以下、*E. coli*と称す) 由来のDNAポリメラーゼIのラージフラグメント (クレノウ断片) 等が挙げられる。また、本発明に使用できるDNAポリメラーゼは、常温性から耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。*B. ca*は生育至適温度が約70℃である好熱性細菌であり、この細菌由来の*B. ca* DNAポリメラーゼは、DNA依存DNAポリメラーゼ活性、RNA依存DNAポリメラーゼ活性 (逆転写活性)、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。上記の酵素は、その本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換えタンパク質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加えたものであっても良く、このような酵素の例として、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損させた*B. ca* DNAポリメラーゼである*B. ca* BEST DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) 等が挙げられる。

【0050】なお、DNAポリメラーゼの中には、特定の条件でエンドヌクレアーゼ活性、例えば、RNase H活性を有するものが知られている。このようなDNAポリメラーゼを本発明の方法に用いることができる。すなわち、該DNAポリメラーゼをRNase H活性が発現されるような条件下、例えばMn²⁺の存在下で使用する態様が挙げられる。該態様においては、上記RNase Hを添加することなく本発明の方法を実施することができる。すなわち、Mn²⁺を含有する緩衝液中で上記の*B. ca* DNAポリメラーゼがRNase H活性を示すことができる。なお、上記の態様は*B. ca* DNAポリメラーゼに限定されるものではなく、RNase H活性を併せ持つことが知られている公知のDNAポリメラーゼ、例えばサーマス サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) 由来の*T. th* DNAポリメラーゼも本発明に使用することができる。

【0051】(5) 本発明の標的核酸の増幅方法
本発明の方法は、上記(1)に示されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上記(2)に示された上流オリゴヌクレオチドプライマーをそれぞれ少なくとも1種類使用し、さらに上記(3)に示されたエンドヌクレアーゼおよび上記(4)に示されたDNAポリメラーゼを

RNase H活性を有するDNAポリメラーゼをRNase H活性が発現するような条件で使用することができる。当該方法では、伸長反応の基質となるヌクレオチド3リン酸としてPCR法等に使われるdNTP、すなわちdATP、dCTP、dGTP、dTTPの混合物が好適に使用できる。また、dUTPを基質として用いてもよい。さらに、当該dNTPは、使用されるDNAポリメラーゼの基質となる限りにおいては、dNTP (デオキシリボヌクレオチド3リン酸) のアナログ、たとえば7-デアザ-dGTP、dITP等のヌクレオチド3リン酸を含んでいてもよい。また、dNTPあるいはdNTPアナログの誘導体を使用してもよく、官能基を有する誘導体、例えばアミノ基を有するdUTPを含んでいてもよい。当該方法では、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するが、当該プライマーは、例えば、DNA合成機等を用いて通常の合成方法と同様に調製することができる。

【0052】本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーと上流オリゴヌクレオチドプライマーの使用量は、標的核酸の塩基配列、目的の増幅断片長及び使用する反応系組成により調整すれば良く、例えば増幅産物量を目安に調整することができる。特に限定はされないが、例えばキメラオリゴヌクレオチドプライマー：上流オリゴヌクレオチドプライマーのモル比が、100：1.25～100：10の範囲が好適であり、特に100：2.5～100：5の範囲が好適に使用できる。

【0053】本発明の方法においては、使用される酵素の活性が反応中に低下するおそれのある場合には、反応の途中で当該酵素をさらに添加することができる。添加する酵素は、反応開始時に反応液中に含まれる酵素と同じものでもよいし、同じ作用を示す異なる種類の酵素であってもよい。すなわち、反応途中で添加することにより、検出感度の向上あるいは増幅産物量の増大等の効果が得られるならば、添加する酵素の種類及び該酵素の性質には何ら限定はない。

【0054】本発明の方法において鋳型となる核酸、すなわちDNAまたはRNAは、当該核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から調製、あるいは単離したものでもよい。さらに、上記試料を直接、本発明の核酸増幅反応に使用してもよい。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織 (例えば、癌組織、リンパ節等)、細胞培養物 (例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等) のような生体由来試料、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料 (食品、生物学的製剤等)、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試

料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破碎物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、mRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。さらに上記試料中に含まれる核酸が公知方法で増幅されたDNAあるいはRNA等の核酸等も好適に使用できる。

【0055】これら材料からの核酸含有調製物の調製には特に限定はなく、例えば、界面活性剤による溶解処理、超音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌、フレンチプレスの使用等により行うことができる。幾つかの例においては、さらに操作を加えて核酸を精製することが有利である（例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき）。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度勾配遠心分離等の公知方法により実施される。

【0056】RNA由来の配列を有する核酸を増幅したい場合には、当該RNAを鋳型とした逆転写反応によって合成されたcDNAを鋳型として本発明の方法を実施すればよい。本発明の方法に適用することができるRNAには、逆転写反応に使用されるプライマーが作製可能なものであれば特に制限はなく、試料中の全RNAの他、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子種が挙げられる。

【0057】上記の逆転写反応に使用されるプライマーは、使用される反応条件において鋳型RNAにアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーは、特定の鋳型RNAに相補的な塩基配列を有するプライマー（特異的プライマー）の他、オリゴdT（デオキシチミン）プライマーやランダムな配列を有するプライマー（ランダムプライマー）であっても良い。逆転写用プライマーの長さは、特異的なアニーリングを行う観点から、好ましくは6ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは9ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは100ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは30ヌクレオチド以下である。さらに、逆転写用プライマーとして、逆転写後のcDNAを鋳型とした本発明の核酸増幅法を行う際に鎖置換反応のためのプライマーとして使用可能な上記

(1)に記載された性質を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー、あるいは上記(2)記載の性質を有する上流オリゴヌクレオチドプライマーのいずれもが好適に使用することができる。すなわち、RNAからの逆転写反応に使用できるものであれば特に限定はない。

【0058】上記の逆転写反応に使用される酵素としては、RNAを鋳型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素（AMV RTase）、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素（MMLV RTa

se）、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素（RAV-2 RTase）等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することもできる。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が好適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ（Tth DNAポリメラーゼ等）、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に限定はないが、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼが好ましく、B. st由来DNAポリメラーゼ（Bst DNAポリメラーゼ）、さらにBca DNAポリメラーゼが好ましい。例えば、Bca DNAポリメラーゼは、逆転写反応にマンガンイオンを必要とせず、また、高温条件下で鋳型RNAの二次構造形成を抑制しながらcDNAを合成することができる。上記の逆転写酵素活性を有する酵素も、当該活性を有している範囲において天然体、変異体のいずれもが使用できる。

【0059】また、別の態様としては、増幅しようとする塩基配列を含むDNAあるいはRNAをあらかじめ複製した後、本発明の方法の鋳型となる核酸として用いてもよい。該複製の方法としては、特に限定はされないが、増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を挿入したベクターで適当な宿主を形質転換させた後、得られた形質転換体を培養して、上記増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を挿入したベクターを抽出して使用する方法が例示される。該ベクターは、宿主内で安定して複製されるものであれば特に限定はなく、例えば、pUC系、pBluescript系、pGEM系、コスミド系、ファージ系のいずれもが好適に使用できる。また、宿主は、使用されるベクターを保持することができるものであれば特に限定はなく、例えば、培養が容易な大腸菌等が例示される。

【0060】さらに、上記複製の方法の別の態様としては、増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を鋳型としてRNAポリメラーゼで該塩基配列を有するRNAを転写した後、該RNAをそのまま、あるいは逆転写反応によりcDNAとして本発明の方法の鋳型に用いてもよい。上記の増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片はRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有していれば特に限定はなく、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するベクターに挿入されたものでもよいし、末端にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するアダプターあるいはカセットをライゲーションさせたものでもよいし、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するプライマーと適切な鋳型を用いて酵素的に合成したものであってもよい。すなわち、上記の増幅しようとする塩基配列を含む核酸断片を、上記のように配置されたRNAポリメラーゼのプロモーター配列を用いて、RNAの形で複製、増幅することができる。上記ベクターは、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するも

る。こうして先に合成されたプライマー伸長鎖が新たなプライマー伸長鎖に置換される。

【0068】本発明の核酸増幅方法は、鋳型核酸に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーと、置換鎖に相補的なもう1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーの2組のプライマーを使用して実施することができる。この場合、2本鎖DNAにまずキメラオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングしてそれぞれの相補鎖を合成し、さらにそれぞれの相補鎖に上流オリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングしてDNA伸長反応を起し、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの伸長鎖を鎖置換していくと考えられる。また、この伸長反応においては、鋳型交換反応も並行して進むと考えられる。この態様を使用すると、各反応産物が他のプライマーのための鋳型として機能できることは明らかである。このように鋳型量が増加することにより、非直線的に増幅産物が増加していく。

【0069】二本鎖DNAを鋳型に用いて本発明の核酸増幅方法を実施する場合には、二本鎖のそれぞれにアニーリングするキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを使用することにより、両方の鎖を増幅反応の鋳型とすることができる。二本鎖DNAを鋳型に反応を開始する場合には、キメラオリゴヌクレオチドプライマー、4種のデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP)、DNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを反応液に添加する。熱処理により二本鎖DNAを変性し、かつ耐熱性の酵素を使用しない場合には、変性後に酵素を添加することが好ましい。

【0070】二本鎖の鋳型DNAと2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを使用する本発明の核酸増幅方法の態様においては、反応の条件等にもよるが、各プライマーから伸長反応中のそれぞれの鋳型-伸長鎖中間体の間で鋳型の交換が起こり、合成されたプライマー伸長鎖同士がアニーリングした二本鎖核酸を生成することがある。この二本鎖核酸は両端にキメラオリゴヌクレオチドプライマーを有しており、次いでその両端から再び鎖置換による相補鎖伸長反応を開始することができる。この反応の結果、一端にプライマーの配列を有する増幅産物が生成される。さらに、この反応中に鋳型の交換が起こった場合には前記と同様な二本鎖核酸が再度生成される。

【0071】本発明により、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを使用し、鋳型交換反応を行う工程を包含する核酸の増幅方法が提供される。当該鋳型交換反応においては、鋳型となる二本鎖核酸と、それぞれの鎖の塩基配列に実質的に相補的な2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーと、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼの存在下

に、該鋳型に相補的な2種のプライマー伸長鎖が合成される。該プライマー伸長鎖の合成の途中において、プライマー伸長鎖のそれぞれの鋳型から他方のプライマー伸長鎖への鋳型の交換が起こる。

【0072】ここで、鋳型交換反応とは、2本鎖核酸の両側からの鎖置換反応による相補鎖の合成が行われる際に、DNAポリメラーゼがその鋳型を交換し、他方のDNAポリメラーゼが新規に合成してきた相補鎖をそれぞれ鋳型として、以降の相補鎖合成を行うことを言う。言い換えれば、鋳型となる2本鎖核酸をそれぞれのプライマー及び鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼで処理し、該鋳型に相補的な伸長鎖を生成せしめる反応において、該伸長鎖を合成中に、DNAポリメラーゼによってプライマー伸長鎖が当初の鋳型から、他方のプライマー伸長鎖へと能動的にスイッチングせしめる反応を言う。

【0073】本発明には、鎖置換反応中に上記の鋳型交換反応を行う能力を有するDNAポリメラーゼが好適に使用でき、例えば、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失したBca DNAポリメラーゼの変異体酵素が特に好適に使用される。当該酵素はBca BEST DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)として市販されており、また、該酵素の遺伝子を含む大腸菌、Escherichia coli HB101/pUI205(FERM B P-3720)より日本特許第2978001号に記載の方法によって調製することもできる。

【0074】また、本発明の増幅方法において、キメラオリゴヌクレオチドプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位が切断される際に、当該切断によって生じる5'側の断片(プライマー部分)がリボヌクレオチドを含有しないように切断される場合がある。こうして生じたプライマー部分から伸長されたプライマー伸長鎖はもはやエンドヌクレアーゼにより切断されず、この結果、末端にプライマーの配列を有する増幅産物が生成される。上記のように、本発明の核酸増幅方法においてはプライマーの配列を含まない増幅産物の他、一端、もしくは両端にプライマーの配列を有する産物が生成しうる。これらの産物も本発明にいう増幅産物に包含される。

【0075】キメラオリゴヌクレオチドを使用する本発明の核酸増幅方法においては、増幅領域が連なった重合体を生成する場合がある。このような重合体は増幅領域が複数個、いずれも同じ向きに連なったものであり、電気泳動による増幅産物の解析ではラダー状のバンドとして確認される。当該重合体の生成は、増幅される領域、該領域のサイズ、その隣接領域、使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列あるいは反応の条件等により影響を受けることが考えられている。

【0076】上記の重合体は、増幅領域を複数個含むものである。当該重合体は、例えば適切なプローブとのハイブリダイゼーションによって多数のプローブとハイブリダイズし、当該重合体が強いシグナルを発生すること

のであれば特に限定はなく、例えば、pUC系、pBluescript系、pGEM系、コスミド系、ファージ系のいずれもが好適に使用できる。また、該ベクターは、環状のままあるいは直鎖状に処理したもののいずれもが好適に使用できる。さらに、上記の複製、増幅方法に用いられるRNAポリメラーゼは特に限定はなく、例えば、SP6 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼあるいはT3 RNAポリメラーゼ等が好適に使用できる。

【0061】上記方法により単離したゲノムDNAやPCRフラグメントのような二本鎖DNA、および全RNA若しくはmRNAから逆転写反応で調製されたcDNAのような一本鎖DNAのいずれもが本発明において鋳型DNAとして好適に使用できる。上記二本鎖DNAの場合は、一本鎖DNAに変性する工程（デネーチャー）を施したものと変性する工程を施さないもののいずれもが好適に使用できる。

【0062】また、鋳型がPCR増幅産物のような直鎖状二本鎖DNAにおいては、本発明の方法に用いるプライマーがアニーリングする位置を、該DNAの末端から約50塩基程度内側に設定することにより、前述のデネーチャーの工程を行わなくても本発明の核酸の増幅方法を行うことができる場合がある。RNA由来の配列を有する核酸の増幅を目的とする場合には、RNAを鋳型とした逆転写反応によって得られたRNA-cDNA二本鎖核酸を、RNase Hを含有する本発明の増幅用反応液に加えることにより、RNA鎖を分解して一本鎖cDNAとし増幅反応を開始することができる。さらに、本発明のDNAの合成方法に逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有するDNAポリメラーゼを使用することにより、RNAを鋳型とした逆転写反応と、当該反応によって生成したcDNAを鋳型にしたDNA増幅反応とを1種類のDNAポリメラーゼで行なうことができる。

【0063】上記鋳型の長さは、標的配列がその断片中に完全に含まれるか、または標的配列の十分な部分が少なくとも断片中に存在することにより、プライマー配列の十分な結合を提供するようなものがよい。

【0064】本発明の方法では、特に限定するものではないが、鋳型DNAが二本鎖DNAの場合にはそれらを変性して一本鎖にすることにより鋳型DNA鎖へのプライマーの結合を可能にさせることができる。二本鎖DNAが変性する温度、例えば約95℃で保持することは好ましい変性法である。他の方法はpHの上昇を含むが、オリゴヌクレオチドプライマーを標的物に結合させるためには、増幅反応時にpHを低下させる必要がある。上記のような二本鎖を一本鎖DNAに変性する工程、もしくは、鋳型がRNAの場合、逆転写反応によりcDNA（一本鎖DNA）を調製する工程の後、等温条件下において、連続的に核酸が増幅される。ここで、「連続的に」とは、反応温度、反応液組成の変更を伴わずに反応

が進行していることを意味する。また、本明細書において「等温」とは、酵素および核酸鎖が上記各工程において機能する、実質的に一定の温度条件のことを意味する。

【0065】本発明の核酸増幅反応は、例えば、クレノウ断片のような常温性DNAポリメラーゼを使用することにより常温（例えば37℃）でも実施できるが、耐熱性を有する酵素（エンドヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼ）を使用して高温、例えば50℃以上で、さらに例えば60℃以上で実施することができる。この場合、プライマーの非特異的なアニーリングが抑制され、DNA増幅の特異性が向上し、また鋳型DNAの二次構造が解消されることによりDNAポリメラーゼの伸長性も向上する。さらに該方法においては、逆転写反応および核酸の増幅を連続して行なう態様も可能であり、上記反応に逆転写酵素を組み合わせて、あるいは逆転写活性を有するDNAポリメラーゼを使用して、RNA由来の配列を有するDNAを増幅することができる。

【0066】本発明を特に限定するものではないが、本発明の各態様において、好ましくは、まず一本鎖の鋳型DNAに該DNAに相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる。次に鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼの作用により、当該キメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端より鋳型DNAの残りの配列に沿って鋳型DNAに相補的なDNA（プライマー伸長鎖）を伸長させる。その際、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの伸長鎖は、上流オリゴヌクレオチドプライマーからの伸長鎖によって鎖置換される。また、エンドヌクレアーゼは、キメラオリゴヌクレオチドプライマーからの伸長鎖とその相補的な鋳型の二本鎖DNAに作用してプライマー伸長鎖のプライマー部分からの新たなDNAの伸長を開始させる。すなわち、本発明の方法においては、鎖置換反応の起点が少なくとも2カ所生じることになる。このため、本発明の方法の反応初期段階において非直線的な増幅をするキメラオリゴヌクレオチドプライマーのアニーリングするための鋳型が増幅される。この初期増幅反応により本発明の方法は、安定的に増幅効率が向上する。すなわち、標的核酸の検出感度が向上することになる。

【0067】本発明の一つの態様においては、エンドヌクレアーゼは上記の二本鎖DNAにニックを入れるニックング酵素として作用するか、あるいはキメラオリゴヌクレオチドプライマーと鋳型DNAの二本鎖DNA構造を変化させるが、本願発明は理論によって限定はされない。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼがニックの入った二本鎖DNAのニックの3'末端からDNA鎖を再伸長して新たなプライマー伸長鎖を生成し、同時にニックの3'末端から下流のDNAを遊離させ

から、増幅領域を含む核酸の検出を目的とする場合に有用である。また、制限酵素消化等を組み合わせて、重合体より増幅領域、またはその一部をモノマーとして得ることもできる。

【0077】本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、プライマー部分の3'末端から下流への伸長鎖合成に伴い、先に伸長されたDNA鎖の置換を行う必要がある。そして重要なことは置換鎖を分解する可能性のある5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示さないことである。このようなDNAポリメラーゼ、例えば大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損変異体であるクレノウ断片、Bst DNAポリメラーゼ由来の同様の断片（ニューイングランドバイオラプス社製）、Bca由来のBcaBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）が有用である。シークエネース1.0およびシークエネース2.0（米国バイオケミカル社）、ジーン（Gene）第97巻、13～19頁（1991）記載のT5 DNAポリメラーゼおよびφ29 DNAポリメラーゼも使用することができる。通常は5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼであっても、その活性が適当な阻害剤の添加により阻害することが可能な場合は、本発明のDNA合成方法に使用できる。

【0078】本発明の核酸の増幅方法は、変温で行ってもよく、又は等温で行ってもよい。ここで変温とは、各工程の反応を妨げない範囲で各工程の反応温度を変化させることを意味する。次に等温とは、各工程の反応温度を変化させず、各工程が実質的に一定の温度で行われることを意味する。いずれの場合においても、最適の反応条件となるように温度を設定するのは当然である。

【0079】本発明の核酸の増幅方法の1つの特徴としては、核酸の合成方法において温度を上げ下げする必要がないことにある。即ち、本発明は等温での核酸の合成方法を提供する。従来の多くの核酸増幅法は、温度を上下することにより合成鎖から標的物を解離する必要がある、例えばサーマルサイクラーのような特別な反応装置を必要とするが、本発明の方法においては一定温度を保持できる装置のみでも実施することができる。このように、本発明の方法は、単一の温度で実施することができる。好ましくは、プライマーの非特異的なアニーリングが低減され、かつ鋳型となる核酸にプライマーが特異的にアニーリングするように反応温度、ストリンジェンシーのレベルを設定して実施される。特に限定するものではないが、上記のように耐熱性の酵素を用いて本発明の方法を高温条件下で行う事ができる。さらに、反応の効率を高く保つ観点から、本発明の方法は使用する酵素の活性が十分に保持される適当な温度で行うことが好ましい。従って、使用する酵素にもよるが、好ましい反応温度は、約20℃～約80℃であり、さらに好ましくは約30℃～約75℃であり、特に好ましくは、約50℃～

約70℃である。特に高温条件下で反応を行う場合には、常温で反応を行う場合よりも鎖長の長いプライマーを使用することが好ましい。例えば、本発明の方法において反応温度を55℃から60℃あるいは65℃に設定した場合、該方法に使用するプライマーの長さとしては、特に限定するものではないが、例えば12ヌクレオチド～100ヌクレオチドの長さ、好ましくは14ヌクレオチド～50ヌクレオチドの長さ、さらに好ましくは15ヌクレオチド～40ヌクレオチドの長さのプライマーが使用できる。このように反応温度を上げることの効果としては、鋳型DNAの二次構造を解消できることが挙げられ、GC含量の高い鋳型核酸を使用した場合にも所望の核酸が増幅される。また、長鎖長の領域を増幅する場合においても同様の効果がある。該効果は、約60bp～約20kbpの範囲で、さらに約60bp～約4.3kbpの範囲で、特に約60bp～約1500bpの範囲で認められる。

【0080】さらに、鋳型となる核酸のGC含量に応じて反応温度を調節し、増幅効率を向上させることができる。例えば、鋳型となる核酸としてGC含量の低いものを使用する場合には、増幅する鎖長やプライマーのTm値にもよるが、50～55℃で本発明の増幅反応を行うことができる。

【0081】また、本発明の方法において、逆転写酵素活性を持つDNAポリメラーゼ、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼを使用した場合、RNAからcDNAを調製する工程（逆転写反応）を含むRNA由来の核酸の増幅を1種類の酵素のみで簡便に実施することができる。また、RNAからcDNAを調製する工程を独立させて行い、その生成物（cDNA）を本発明の方法に鋳型DNAとして使用することもできる。

【0082】いずれの場合においても、本発明の方法においては、適当な方法、例えば酵素を失活させたり反応温度を低下させて反応を停止させるか、または基質のうちのいずれか一つが使い尽くされるかのいずれかまで繰り返される。

【0083】本発明の核酸の増幅方法は、核酸の増幅を利用した種々の実験操作、例えば核酸の検出、標識、塩基配列の決定に使用することができる。また、本発明の核酸の増幅方法は、in situ核酸増幅方法、DNAチップのような固相担体上での核酸増幅方法あるいは多種類の領域を同時に増幅するマルチプレックス核酸増幅方法として使用することができる。

【0084】本発明の核酸の増幅方法の特徴の一つとして、一本鎖のDNAを調製することが可能なことが挙げられる。この目的のためには、1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法のみならず、2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法を使用することもできる。例えば、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる場合は、一方のオリゴヌクレオ

チドプライマー量を他方の量に対して過剰にして増幅反応を行なう、いわゆるアシンメトリック（非対称）PCR法において採用される方法と同様のプライマー比率によって行なうことができる。当該プライマー比率は、特に限定されるものではないが1：10～1：500の範囲で好適に使用でき、特に好適には1：10～1：100の範囲である。この結果、一方の鎖を置換した産物の量が、他方の鎖を置換した産物の量に比べて過剰になる。

【0085】本発明の核酸の増幅方法によれば実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のDNAを調製することができ、例えば、DNAチップのような核酸固定化物を作製するための一本鎖DNA、標的核酸検出のための一本鎖DNAプローブ、または長鎖PCR法のためのメガプライマーを容易にしかも短時間に作製することができる。また、本発明の方法を使用することにより、センス配列のみ、あるいはアンチセンス配列のみを選択して増幅させることが可能である。従って、本発明はセンス配列あるいはアンチセンス配列を有する核酸の製造方法としても有用である。

【0086】また、本発明の方法は、ピシン、トリシン、ヘペス、リン酸塩あるいはトリス緩衝液中で行うことにより微量の鋳型となる核酸からでも所望の核酸配列領域を増幅することができる。

【0087】さらに、本発明の核酸の増幅方法には経時的な温度調節が可能な反応装置を使用する必要がないため、大容量の反応液を使用して増幅反応を実施することができる。したがって、例えば医薬用途等に使用される核酸の工業的大量製造が可能である。

【0088】また、本発明の核酸増幅方法は、鋳型となる核酸の塩基配列に忠実に増幅産物を生成することができる。本発明の方法におけるDNA合成の誤りの頻度を得られた増幅産物の塩基配列を解析することによって確認したところ、高い忠実度で核酸を増幅できることが知られているLA-PCR法と本発明の方法のそれぞれで得られた増幅産物中に見出された誤りの頻度は同程度であった。すなわち、本発明の方法はLA-PCR法に匹敵する忠実度を有している。

【0089】（6）本発明のキット

本発明は、前述の本発明の核酸の増幅方法に使用されるキットを提供する。1つの実施態様において、該キットは、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるDNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、キメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーの使用のための指示書を含むことを特徴とする。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼならびに鎖置換反応用緩衝液を含むキットは本発明の方法に好適に使用される。あるいは、市販の鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼを指示書に従って選択

し、使用してもよい。さらに、RNAを鋳型とする場合の逆転写反応用試薬を含んでもよい。DNAポリメラーゼは、上記（4）記載の本発明に使用されるDNAポリメラーゼから選択することができる。また、エンドヌクレアーゼは、上記（3）記載のエンドヌクレアーゼから選択することができる。

【0090】上記「指示書」とは、当該キットの使用方法、例えば鎖置換反応用試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのような電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

【0091】さらに、本発明のキットにおいては、ピシン、トリシン、ヘペス、リン酸塩あるいはトリス緩衝成分を含有する反応バッファー、及びアニーリング溶液が含まれていてもよい。また、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼやRNAse Hが含まれていてもよい。さらに、修飾されたデオキシリボヌクレオチドあるいはデオキシヌクレオチド3リン酸のアナログを含有していてもよい。

【0092】さらに、標的核酸の検出方法に使用されるキットは、上記の指示書、増幅反応のための試薬類の他、標的核酸の増幅に適したキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマー、増幅された標的核酸を検出するための試薬、例えばプローブ等を含むものであってもよい。

【0093】また、本発明のキットは、上記の本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマー、上流オリゴヌクレオチドプライマー及び/又は本発明のプローブを含有するキットも包含する。

【0094】（7）本発明の組成物

本発明は、前述の本発明の核酸の増幅方法、または本発明の核酸の検出方法に使用される組成物を提供する。該組成物としては、例えば、上記（2）に記載の上流オリゴヌクレオチドプライマー、上記（3）に記載のエンドヌクレアーゼ、上記（4）に記載のDNAポリメラーゼを含有するものが挙げられる。さらに、増幅反応を行うための成分として、緩衝成分やマグネシウム塩、dNTP等を含んでいてもよい。さらに、修飾されたデオキシリボヌクレオチドあるいはデオキシヌクレオチド3リン酸のアナログを含有していてもよい。さらに、緩衝成分やその他の添加物を使用することができる。

【0095】特に好適な態様としては、本発明の核酸増幅方法に適した組成で上記の各種成分が含有された組成物を挙げることができ、該組成物は適切な鋳型とキメラオリゴヌクレオチドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを添加するのみで増幅反応を実施することができる。さらに、増幅対象があらかじめ明らかである場合には、当該増幅対象の増幅に適したキメラオリゴ

ヌクレオチドプライマーを含有する組成物が好適である。

【0096】(8) 本発明の標的核酸の検出方法

本発明の核酸の増幅方法を使用することにより、試料中の標的核酸の検出を行うことができる。当該検出方法は、(a) 上記の本発明の核酸の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；および、(b) 上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程；を包含する。

【0097】上記(a)行程において、RNAを鋳型とする場合は、逆転写反応と核酸増幅反応を1段階で行ってもよい。特に限定はされないが、逆転写酵素と鎖置換型DNAポリメラーゼの組み合わせとして例えば、AMV RTase、MMLVRTaseあるいはRAV-2 RTaseとBca DNAポリメラーゼの組み合わせが好適に使用できる。

【0098】上記方法は試料中に存在する特定の遺伝子の検出、定量に利用することができる。すなわちDNAまたはRNA等の核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から特定の遺伝子を検出、定量することができる。前述の試料としては、特に限定はないが、例えば、全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織（例えば、癌組織、リンパ節等）、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等）のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料（食品、生物学的製剤等）、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料から特定の遺伝子を検出、定量することができる。さらに例えば、ウイロイド、ウイルス、カビ、細菌あるいはその他の微生物等由来の特定の遺伝子をターゲットとすることにより、該遺伝子の存在の有無によって上記の微生物の存在を検出、定量等に利用することができる。特に、病原性の微生物の検出方法は衛生、環境分野で有用である。さらに、生物の遺伝子型の判別や遺伝子の発現状態を調べるために本発明の方法を使用することもできる。特に疾病関連遺伝子、例えば細胞の癌化に関連する遺伝子等の検出、発現状態の確認は医療分野において有用である。上記検出法のための鋳型として使用される核酸は、RNAあるいはDNAのいずれもが好適に使用できる。

【0099】さらに、本発明の標的核酸の検出方法により、標的核酸上の塩基配列の違いを判別することができる。この態様においては、使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端部分が、標的とされる塩基配列の判別しようとする特定の塩基付近に位置するように、たとえば、該塩基とプライマーの3'末端の塩基とが水素結合を形成するようにプライマーが設計される。このようなキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅反応を実施した場合、プライマーの3'末

端部分の塩基配列と鋳型の塩基配列との間にミスマッチが存在する場合には標的核酸からの増幅が起こらず、増幅産物の生成が見られない。当該方法により、点突然変異、一塩基置換（Single nucleotide polymorphism、SNP）のような遺伝子上の特定の塩基についての情報を得ることが可能である。

【0100】本発明の標的核酸の検出方法は、核酸を含有する試料より直接、標的核酸を増幅することにより実施することができる。この場合、増幅される標的核酸の鎖長には、特に限定はないが、感度よく標的核酸を検出する観点からは、例えば200bp以下、さらに好ましくは150bp以下の領域が有効である。該増幅鎖長となるように本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設定することにより、高感度に試料中の標的核酸を検出することができる。

【0101】さらに、本発明の検出方法では、ピシン、トリシン、ヘペス、リン酸塩あるいはトリス緩衝成分を含有する反応バッファー、及びスペルミジンやプロピレンジアミンを含有するアニーリング溶液の使用により、微量の核酸試料からもさらに高感度に標的核酸を検出することができる。この場合、使用するエンドヌクレアーゼとDNAポリメラーゼは特に限定はされないが、例えばアルカエオグロバス属細菌由来のRNaseH及びBcaBEST DNAポリメラーゼの組み合わせが好ましい。特に、上記エンドヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼはともにその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には検出感度の向上あるいは増幅産物量の増加を指標にして、該バッファーの組成および酵素の添加量を調整すればよい。

【0102】本発明の検出方法においては、標的核酸の増幅の際に、dUTPを基質として取り込ませることができる。したがって、dUTPを基質に用いた場合には、ウラシル N-グリコシダーゼ（uracil N-glycosidase：UNG）を利用して増幅産物を分解し、増幅産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することができる。

【0103】上記(b)工程には公知の核酸検出方法、例えば電気泳動により特定のサイズの反応産物を検出する方法や、プローブとのハイブリダイゼーションによる検出等を使用することができる。さらに、磁気ビーズ等を組み合わせた検出方法も好適に使用できる。上記電気泳動による検出には、通常、エチジウムブロマイド等の蛍光物質が使用されるが、プローブとのハイブリダイゼーションを組み合わせてもよい。また、プローブは放射性同位元素による標識の他、ビオチンや蛍光物質のような非放射性的の標識を施したものが使用できる。この他、上記(a)工程において標識ヌクレオチドを使用することにより、増幅産物に標識ヌクレオチドを取り込ませて検出を容易にすることや該標識を利用した検出用シグナルの増強を行うことができ、さらに蛍光偏光法、蛍光エ

エネルギー転移等を利用した検出を行うことも可能である。さらに、適切な検出系を構築することにより、標的核酸を自動的に検出することや、あるいは標的核酸の定量を行うことが可能である。また、ハイブリッドクロマト法による肉眼検出法も好適に使用できる。

【0104】消光状態になるような距離で配置された2種類以上の蛍光物質で標識されたリボヌクレオチド(RNA)プローブあるいはリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドで構成されるキメラオリゴヌクレオチドプローブのいずれもが本発明の検出方法に使用することができる。当該プローブは蛍光を発することはないが、これに相補的な標的核酸由来の増幅DNAにアニリングした場合、RNase Hは該プローブを分解する。この結果、プローブ上の蛍光物質間の距離が増大して蛍光が発せられるようになり、標的核酸の存在を知ることができる。RNase Hを使用して本発明の核酸の増幅方法が実施された場合には、その反応液中に上記のプローブを添加するだけで標的核酸を検出することができる。当該プローブの標識に使用される蛍光物質としては、例えば、6-FAM(6-carboxyfluorescein)とTAMRA(N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine)との組み合わせが好適に使用できる。

【0105】さらに、本発明は前記の標的核酸の検出方法に使用されるプローブを提供する。本発明のプローブは、上記の本発明の核酸の増幅方法により増幅された核酸に通常のハイブリダイゼーションの条件において標的核酸にハイブリダイズし得るものであれば特に限定はないが、増幅産物を特異的に検出する観点からは、例えば厳密な条件として当業者に知られている条件でハイブリダイズするものが好ましい。前記、厳密なハイブリダイゼーション条件は、例えば1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス(T. Maniatis)ら編集、モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル第2版(Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.)に記載されている。具体的な厳密な条件としては、例えば以下の条件を挙げることができる。すなわち、0.5% SDS、5×デンハルト[Denhardt's、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400]及び100 µg/mlサケ精子DNAを含む6×SSC(1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)中で、使用するプローブのTm値より約25℃低い温度で4時間～一晩保温を行う条件を言う。前記プローブは、標的核酸の検出を容易にするために上記のような標識を付されたものを使用することができる。

【0106】本発明の核酸の増幅方法の等温下における増幅方法においては、サーマルサイクラーのような装置

を必要としない。また本発明の増幅方法では、使用するプライマーを1種類もしくは2種類と従来法よりも少なくすることができる。dNTPのような試薬もPCR等で用いられるものを流用できるため、ランニングコストを従来法よりも低くすることができる。そのため、ルーチンワークを行なっている遺伝子検査等の分野で好適に使用できる。さらに、本発明の方法はPCR法よりも短時間により多くの増幅産物を得られることから、簡便、迅速、高感度な遺伝子検出方法として利用することができる。

【0107】ゲノムレベルの遺伝子解析においては、大量の塩基配列を解析するために反応系を微量化し、さらに集積度を高める試みがなされている。その手段の一つとして、最先端の超微細加工技術を駆使して、ゲノム解析の基本プロセス、例えば、DNAの細胞からの抽出、DNA増幅反応、電気泳動、ハイブリダイゼーション、目的DNAの検出等のプロセスを数cm角～指先大のマイクロチップ上に集積化したものが開発されている。該システムはマイクロチップ、あるいはナノチップと呼ばれている。このようなシステムにおける遺伝子増幅反応として現在はPCR法が考えられているが、該方法は経時的に温度の上昇、下降を繰り返す温度制御のための手段を必要とするため、システムが複雑なものとなる。これに対し、等温条件下で核酸を増幅できる本発明の方法はシステムの単純化が可能であり、上記のような集積化されたシステムでの利用に非常に好適である。さらに、本発明の技術を利用してさらに高い集積度のシステムの構築が可能となる。

【0108】

【実施例】以下に実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

【0109】参考例1 アルカエオグロバス フルギダスのRNase HI I遺伝子のクローニング

(1) アルカエオグロバス フルギダス ゲノムDNAの調製

アルカエオグロバス フルギダス(Archaeoglobus fulgidus、ドイッチェザムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルツレンGmbHより購入：DSM4139) 8ml相当分の菌体を集め、100 µlの25%ショ糖、50 mM トリス-HCl (pH 8.0) に懸濁し、20 µlの0.5 M EDTA、10 µlの10 mg/ml 塩化リゾチーム(ナカライテスク社製)水溶液を加えて、20℃で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に800 µlの150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 mM トリス-HCl (pH 8.0)、10 µlの20 mg/ml プロテイナーゼK(宝酒造社製)及び50 µlの10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37℃で1時間保温した。反応終了後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈

殿、風乾した後に50 μ lのTEに溶解してゲノムDNA溶液を得た。

【0110】(2) RNaseHII遺伝子のクローニング

アルカエオグロバス フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*) は全ゲノム配列が公開されており [ネイチャー (Nature)、第390巻、第364-370頁 (1997)]、RNaseHIIのホモログをコードする遺伝子 (AF0621) が1つ存在することが明らかになっている (配列番号1、<http://www.tigr.org/tdb/CMR/bt> 10 [m/htmls/SplashPage.html](http://www.tigr.org/tdb/CMR/bt))。そこで、このAF062

1遺伝子 (配列番号1) の配列をもとにプライマーAfuNde (配列番号2) 及びAfuBam (配列番号3) を合成した。上記(1) で得たアルカエオグロバス

フルギダス ゲノムDNA30ngを鋳型にして、20pmolのAfuNde及び20pmolのAfuBamをプライマーに用い、100 μ lの容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはパイロベストDNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94℃で30秒、55℃で 20 30秒、72℃で1分を1サイクルとし、40サイクル行なった。増幅した約0.6kbのDNA断片をNdeI 及びBamHI (ともに宝酒造社製) で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpTV119Nd (pTV119NのNcoIサイトをNdeIサイトに変換したもの) のNdeI 及びBamHI間に組込んだプラスミドpAFU204を作製した。

【0111】(3) RNaseHII遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

上記(2) で得られたpAFU204の挿入DNA断片 30 の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNaseHIIをコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号4に示す。また、該塩基配列から推定されるRNaseHIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号5に示す。

【0112】なお、プラスミドpAFU204で形質転換された大腸菌JM109は、*Escherichia coli* JM109/pAFU204と命名、表示され、平成13年2月22日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18221として寄託され、また前記独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7691 [国際寄託への移管請求日：平成13年8月2日] として寄託されている。

【0113】(4) 精製RNaseHII標品の調製
上記(2) で得られたpAFU204で大腸菌JM109を形質転換し、得られたpAFU204を含む大腸菌JM109を100 μ g/mlのアンピシリンを含む2 50

リットルのLB培地に植菌し、37℃で16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を37.1mlのソニケーションバッファー [50mMトリス-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、2mM フェニルメタンスルフォニルフルオリド] に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を70℃、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpmで10分の遠心分離を行い、上清を集め、40.3mlの熱処理上清液を得た。

【0114】この熱処理上清液をバッファーA [50mMトリス-HCl (pH8.0)、1mM EDTA] で平衡化したRESOURCE Qカラム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) に供し、FPLCシステム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。バッファーAで平衡化したRESOURCE Sカラム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) に供し、FPLCシステム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIはRESOURCE Sカラムを素通りした。素通りしたRNaseHII画分40.0mlを50mM NaClを含むバッファーB [50mMトリス-HCl (pH7.0)、1mM EDTA] 2リットルを外液として、2時間の透析を3回行なった。透析後の酵素液40.2mlを50mM NaClを含むバッファーBで平衡化したHiTrap-heparinカラム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) に供し、FPLCシステムを用いて 50~550mM NaCl直線濃度勾配により溶出した。その結果、約240mM NaClのところに溶出されたRNaseHII画分を得た。このRNaseHII画分7.8mlをセントリコン-10 (アミコン社製) を用いた限外ろ過により濃縮し、約600 μ lの濃縮液を4回に分けて100mM NaCl、0.1mM EDTAを含む50mMトリス-HCl (pH7.0) で平衡化したSuperose6ゲルろ過カラム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) に供し、同じバッファーで溶出を行なった結果、RNaseHIIは、30.0キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNaseHIIが1量体として存在する場合に相当する。こうして溶出されたRNaseHIIをAfuRNaseHII標品とした。

【0115】上記で得られたAfuRNaseHII標品を用いて、以下の方法により酵素活性を測定した。AfuRNaseHII標品1 μ lに40℃であらかじめインキュベーションした反応液 [20mM ヘプス-水酸化カリウム (pH7.8)、0.01%牛血清ア

ルブミン（宝酒造社製）、1%ジメチルスルホキシド、4mM 酢酸マグネシウム、20 μ g/mlポリ（dT）（アマシヤム ファルマシア バイオテック社製）、30 μ g/mlポリ（rA）（アマシヤム ファルマシア バイオテック社製）] 100 μ lを添加し、40℃で10分間反応させた後、10 μ l 0.5M EDTA（pH 8.0）で反応を停止し、260nmの吸収を測定した。その結果、Afu RNaseHII標品にRNaseH活性が認められた。

【0116】耐熱性RNaseHのユニット数は、次の方法により算出した。ポリ（rA）及びポリ（dT）（ともにアマシヤム ファルマシア バイオテック製）1mgをそれぞれ1mM EDTAを含む40mM トリス-HCl（pH 7.7）1mlに溶解し、ポリ（rA）溶液及びポリ（dT）溶液を調製した。次に、4mM MgCl₂、1mM DTT、0.003%BSA、4%グリセロールを含む40mM トリス-HCl（pH 7.7）に、終濃度20 μ g/mlとなるポリ（rA）溶液、終濃度30 μ g/mlとなるポリ（dT）溶液を加え、37℃で10分間反応後、4℃に冷却し、ポリ（rA）-ポリ（dT）溶液を調製した。このポリ（rA）-ポリ（dT）溶液100 μ lに任意に希釈した酵素液1 μ lを加え、40℃で10分間反応させ、0.5M EDTA 10 μ lを加えて反応を停止させた後、260nmの吸光度を測定した。対照として、上記反応液に0.5M EDTA 10 μ lを加えた後、40℃で10分間反応させ、吸光度を測定した。その後、EDTA非存在下で反応させ求めた吸光度から対照の吸光度を引いた値（吸光度差）を求めた。すなわち、酵素反応によってポリ（rA）-ポリ（dT）ハイブリッドから遊離したヌクレオチドの濃度を吸光度差から求めた。RNaseHの1単位は、1nmolのリボヌクレオチドが遊離したのに相当するA₂₆₀を10分間に増加させる酵素量とし、下記の式に従って算出した。単位（unit）＝〔吸光度差×反応液量（ml）〕／0.0152×（110／100）×希釈率

【0117】実施例1

（1）上流オリゴヌクレオチドプライマーの設計

キメラオリゴヌクレオチドプライマーと鋳型となる核酸の該プライマーのアニールングする位置の3'側の任意の位置にアニールング可能な上流オリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせについて検討した。まず、配列表の配列番号6及び7に記載の塩基配列を有する結核菌IS6110遺伝子検出用キメラオリゴヌクレオチドプライマー、MTIS-2F及びMTIS-2RプライマーをDNA合成機により合成した。さらに、結核菌IS6110遺伝子の塩基配列を有し、鋳型となる核酸のキメラオリゴヌクレオチドプライマーのアニールングする位置の3'側の任意の位置にアニールングできる配列表の配列番号8及び9記載の上流オリゴヌクレオチドプライ

マー、MTIS-F721およびMTIS-R920をそれぞれ合成した。なお、オリゴヌクレオチドMTIS-F721はセンス方向のプライマーであり、MTIS-R920はアンチセンス方向のプライマーである。

【0118】（2）鋳型の調製

カルメットگران菌東京株（乾燥BCGワクチン、日本ビーシージー製造株式会社製）12mgより常法に従い、結核菌ゲノムDNAを調製した。

【0119】（3）ICAN反応

10fg/ μ l～100pg/ μ lの濃度の上記ゲノムDNA 1 μ lあるいは陰性対照の水1 μ lと、これに各50pmolのMTIS-2F及びMTIS-2Rプライマーおよび各2.5pmolのMTIS-F721およびMTIS-R920プライマー、0.5mM dNTP混合液、32mM HEPES-KOH緩衝溶液（pH 7.8）、100mM 酢酸カリウム、4.0mM 酢酸マグネシウム、0.01%ウシ血清アルブミン、1.0%ジメチルスルホキシド、4.375UのAfu由来RNaseH、2.64UのBcaBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を含む全液量25 μ lの反応液をサーマルサイクラーで60℃、1時間保温した。なお、対照として上流オリゴヌクレオチドプライマーを添加しない区分を設定した。反応終了後、この反応液5 μ lを3.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果を図1に示す。図1Aは、上流オリゴヌクレオチドプライマー無添加の反応系であり、レーン1は100bp DNAラダーマーカー、レーン2は陰性対照（水）、レーン3：10fgの鋳型、レーン4は100fgの鋳型、レーン5は1pgの鋳型、レーン6は10pgの鋳型、レーン7は100pgの鋳型の場合を示す。さらに、図1Bは、上流オリゴヌクレオチドプライマーを添加した反応系であり、レーン1は100bp DNAラダーマーカー、レーン2は陰性対照（水）、レーン3：10fgの鋳型、レーン4は100fgの鋳型、レーン5は1pgの鋳型、レーン6は10pgの鋳型、レーン7は100pgの鋳型の場合を示す。

【0120】図1に示すように上流オリゴヌクレオチドプライマー無添加の区分においては1pgの鋳型量まで増幅が認められた。一方、上流オリゴヌクレオチドプライマーを添加した区分において10fgの鋳型量まで増幅が認められ、添加しない区分と比較して2桁の感度上昇が認められた。なお、10fgの鋳型量は上記ゲノムDNAの2コピーに相当する。以上のことから、キメラオリゴヌクレオチドプライマーと鋳型となる核酸の該プライマーのアニールングする位置の3'側の任意の位置にアニールング可能な上流オリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせることにより検出感度が向上することが確認できた。

【0121】

【発明の効果】本発明により、キメラオリゴヌクレオチ

ドプライマー及び上流オリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせたDNA合成反応により標的核酸の塩基配列中の特異的増幅に適した領域を増幅することを特徴とする標的核酸の増幅方法が提供される。また、該標的核酸の増幅方法で得られた標的核酸の増幅断片を検出する工程を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法が提供される。

【0122】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法により増幅された増幅DNA断片のアガロース電気泳動写真の結果を示す図である。

【0123】配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1: Nucleotide sequence of AF0621 from Archaeoglobus fulgidus.

SEQ ID NO:2: PCR primer AfuNde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

SEQ ID NO:3: PCR primer AfuBam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

SEQ ID NO:4: Nucleotide sequence of ORF in RNaseHI*

20

* I gene from Archaeoglobus fulgidus.

SEQ ID NO:5: Amino acid sequence of RNaseHII from Archaeoglobus fulgidus.

SEQ ID NO:6: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MTIS2F to amplify a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA. "nucleotides16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO:7: Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MTIS2R to amplify a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA. "nucleotides19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO:8: Designed oligonucleotide primer designated as MTIS-F721 to amplify a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA.

SEQ ID NO:9: Designed oligonucleotide primer designated as MTIS-R920 to amplify a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA.

【0124】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for amplification of nucleic acids

<130> T-1674

<160> 9

<210> 1

<211> 626

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 1

```
atgaaggcag gcatcgatga ggctggaaag ggctgcgtca tcggcccact ggttggttgca 60
ggagtggctt gcagcgatga ggataggctg agaaagcttg gtgtgaaaga ctccaaaaag 120
ctaagtcagg ggaggagaga ggaactagcc gaggaataa ggaaaatctg cagaacggag 180
gttttgaaag tttctcccga aaatctcgac gaaaggatgg ctgctaaaac cataaacgag 240
atgttgaaag agtgctacgc tgaaataatt ctcaggctga agccggaaat tgcttatgtt 300
gacagtcttg atgtgattcc cgagagactt tcgaggggagc ttgaggagat tacgggggttg 360
agagttgttg ccgagcaciaa ggcggacgag aagtatcccc tggtagctgc ggcttcaatc 420
atcgcaaagg tggaaaggga gcgggagatt gagaggctga aagaaaaatt cggggatttc 480
ggcagcggct atgcgagcga tccgaggaca agagaagtgc tgaaggagtg gatagcttca 540
ggcagaattc cgagctgcgt gagaatgcgc tggaagacgg tgtcaaactt gaggcagaag 600
acgcttgacg atttctaaac gaaacc 626
```

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer AfuNde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

35

<400> 2

aagctgggtt tcatatgaag gcaggcatcg

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer AfuBam for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

<400> 3

tggtataaac ggatccgttt agaaatcgtc

<210> 4

<211> 638

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 4

catatgaagg caggcatcga tgaggctgga aagggtcgcg tcatcgggcc actggttggt 60

gcaggagtgg cttgcagcga tgaggatagg ctgagaaagc ttggtgtgaa agactccaaa 120

aagctaagtc aggggaggag agaggaacta gccgaggaaa taaggaaaat ctgcagaacg 180

gaggttttga aagttttctc cgaaaatctc gacgaaagga tggctgctaa aaccataaac 240

gagattttga aggagtgcga cgctgaaata attctcaggc tgaagccgga aattgcttat 300

gttgacagtc ctgatgtgat tcccagagaga ctttcgaggg agcttgagga gattacgggg 360

ttgagagttg tggccgagca caaggcggac gagaagtatc ccctggtagc tgcggcttca 420

atcatcgcaa aggtggaaaag ggagcgggag attgagaggc tgaaagaaaa attcggggat 480

ttcggcagcg gctatgcgag cgatccgagg acaagagaag tgctgaagga gtggatagct 540

tcaggcagaa ttccgagctg cgtgagaatg cgctggaaga cgggtgtcaa tctgaggcag 600

aagacgttg acgatttcta aacggatccc cgggtacc 638

<210> 5

<211> 205

<212> PRT

<213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 5

Met Lys Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Lys Gly Cys Val Ile Gly

1 5 10 15

Pro Leu Val Val Ala Gly Val Ala Cys Ser Asp Glu Asp Arg Leu

20 25 30

Arg Lys Leu Gly Val Lys Asp Ser Lys Lys Leu Ser Gln Gly Arg

35 40 45

Arg Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Arg Lys Ile Cys Arg Thr Glu

50 55 60

Val Leu Lys Val Ser Pro Glu Asn Leu Asp Glu Arg Met Ala Ala

65 70 75

Lys Thr Ile Asn Glu Ile Leu Lys Glu Cys Tyr Ala Glu Ile Ile

80 85 90

Leu Arg Leu Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Val Asp Ser Pro Asp Val

95 100 105

Ile Pro Glu Arg Leu Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Thr Gly Leu

110 115 120

Arg Val Val Ala Glu HisLys Ala Asp Glu Lys Tyr Pro Leu Val

125 130 135

37

38

Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ala Lys Val Glu Arg Glu Arg Glu Ile
 140 145 150
 Glu Arg Leu Lys Glu Lys Phe Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Ala
 155 160 165
 Ser Asp Pro Arg Thr Arg Glu Val Leu Lys Glu Trp Ile Ala Ser
 170 175 180
 Gly Arg Ile Pro Ser Cys Val Arg Met Arg Trp Lys Thr Val Ser
 185 190 195
 Asn Leu Arg Gln Lys Thr Leu Asp Asp Phe
 200 205

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MTIS-2F to
 amplify a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA. "nucleotides 16 to 1
 8 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides."

<400> 6

tctcgtccag cgccgcuu

18

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed chimeric oligonucleotide primer designated as MTIS2R to a
 mplify a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA. "nucleotides 19 to 21
 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides."

<400> 7

gacaaaggcc acgtaggcga a

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MTIS-F721 to amplify
 a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA.

<400> 8

agcccgagg accacgatcg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

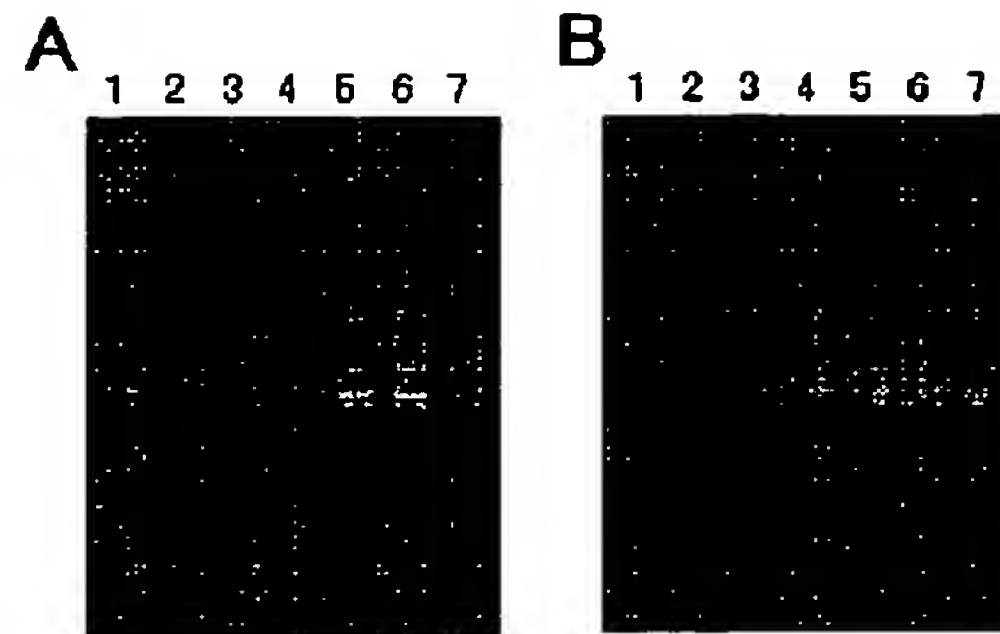
<223> Designed oligonucleotide primer designated as MTIS-R920 to amplify
 a portion of Mycobacterium tuberculosis DNA.

<400> 9

tcgtggaagc gacccgccag

20

【図 1】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA09 CA11
 HA12
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08
 QR42 QR55 QR62 QR82 QS25
 QS34 QS36 QX02